

Deteksi iridovirus pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur.....	3
7 Interpretasi hasil	4
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan.....	6
Lampiran B (informatif) Diagram alur prosedur deteksi iridovirus pada ikan dengan metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	7
Lampiran C (normatif) Diagram alur ekstraksi DNA	8
Bibliografi.....	10
Gambar 1 - Hasil deteksi iridovirus pada ikan dengan metode PCR.....	5
Gambar B.1 - Diagram alur prosedur deteksi iridovirus pada ikan dengan metode PCR	7
Gambar C.1 - Diagram alur ekstraksi DNA.....	9
Tabel 1 - Komposisi bahan amplifikasi	3
Tabel 2 Pengaturan suhu <i>thermocycler</i>	4

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi iridovirus pada ikan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat-rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi iridovirus pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi iridovirus pada ikan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari DNA virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.2

annealing

proses perlekatan antara *primer* dan *template*

2.3

asam nukleat

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya yang dapat berupa asam *deoksiribonukleat* (DNA) atau asam *ribonukleat* (RNA)

2.4

denaturasi

proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA

2.5

ekstension

proses pembentukan DNA baru

2.6

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik virus dari jaringan atau sel

2.7

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.8

iridovirus

virus yang termasuk dalam famili *Iridoviridae*, mempunyai materi genetik DNA untai ganda dan *virion* berbentuk heksagonal

2.9

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus

penyakit yang disebabkan iridovirus biasanya diberi nama sesuai spesies ikan atau organ yang terinfeksi, seperti: *red sea bream* iridovirus (RSIV), *grouper* iridovirus (GIV), *infectious spleen and kidney necrosis* virus (ISKNV), *African lampeye* iridovirus (ALIV) dan *grouper sleepy* iridovirus diseases (GSIVD)

2.10

preparasi

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.11

presipitasi

proses pengendapan senyawa dalam suatu larutan

3 Prinsip

Prinsip dari metoda ini adalah mengisolasi DNA dari organ ikan atau larva ikan yang diduga terinfeksi iridovirus, mengamplifikasi DNA iridovirus, memisahkan DNA hasil amplifikasi dengan elektroforesis, mengamati hasil amplifikasi pada gel agarose dengan menggunakan uv-transilluminator dan melakukan dokumentasi.

4 Peralatan

- a) elektroforesis;
- b) *freezer* (suhu -20 °C).
- c) kamera ;
- d) *microwave/hot plate*;
- e) mikrotube ukuran 1,5 ml dan 0,2 ml;
- f) mikropipet 0.1 µl -2 µl, 2 µl – 20 µl, 20 µl-200 µl, 100 µl-1000 µl;
- g) *mini mixer*;
- h) *pellet pestle*;
- i) peralatan bedah, terdiri dari: *pinset*, gunting, dan *scalpel*;
- j) sentrifus;
- k) *thermocycler*;
- l) timbangan analitik;
- m) UV *transilluminator*;
- n) *flowing waterbath*.

5 Bahan

- a) *agarose*;
- b) akuades;
- c) akuabides;
- d) *buffer TE* (100 mM *tris*-HCl, 10 mM EDTA);
- e) etanol absolut;
- f) *ethidium bromide* (10 mg/ml);
- g) formula PCR:
 - 10x PCR *buffer*;
 - MgCl₂ (25mM);
 - dNTPmix (10 mM);
 - *taq DNA polymerase* (5 Unit).
- h) *marker* (100 bp DNA ladder);
- i) *phenol chloroform isoamylalcohol* (25:24:1);
- j) primer:
 - 1-F: 5'-CTC AAA CAC TCT GGC TCA TC-3' (20 µM)
 - 1-R: 5'-GCA CCA ACA CAT CTC CTA TC-3' (20 µM)
- k) *proteinase K* (10 mg/ml);
- l) *sodium dodecyl sulfat* (SDS);

- m) 5x buffer TBE (*Tris Boric EDTA*; 45 mM *tris boric* dan 1 mM *ethylene diamine tetra acetyc acid* (EDTA));
- n) 6x loading dye mengandung pewarna *bromphenol blue*;
- o) *sodium acetate* 3 M pH 5,2.

CATATAN Pembuatan larutan diuraikan pada Lampiran A.

6 Prosedur

6.1 Preparasi

Ambil organ target berupa jaringan limpa untuk ikan besar atau seluruh bagian tubuh untuk larva dari contoh.

6.2 Ekstraksi DNA

- a) Masukkan sebanyak 20 mg contoh limpa ikan atau seluruh bagian tubuh (larva) ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- b) Homogenisasi contoh dengan 335 μ l *buffer TE*.
- c) Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm (7.826 g, r = 7 cm) selama 10 menit.
- d) Pindahkan 300 μ l supernatan ke dalam mikrotube baru.
- e) Tambahkan 40 μ l SDS 10 % dan 10 μ l *proteinase K* 10 mg/ml.
- f) Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 1 jam menggunakan *flowing waterbath*.
- g) Tambahkan larutan *phenol chloroform isoamylalcohol* sebanyak 300 μ l kemudian dihomogenkan dengan *mini mixer*.
- h) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm (11.269 g, r = 7 cm) selama 5 menit.
- i) Pindahkan fase air ke mikrotube yang baru.
- j) Ulangi proses pada poin g, h, dan i sebanyak 2 kali.
- k) Presipitasi DNA pada fase air dengan 2,5 kali volume etanol absolut dan 0,1 kali *sodium acetate*.
- l) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm (11.269 g, r = 7 cm) selama 10 menit.
- m) Buang supernatan dan keringkan *pellet* pada suhu 25 °C – 27 °C.
- n) Larutkan kembali *pellet* DNA dengan 50 μ l *buffer TE*.
- o) Simpan DNA pada suhu - 20 °C apabila tidak langsung digunakan.

CATATAN Diagram alur ekstraksi alur DNA digambarkan pada Lampiran C.

6.3 Amplifikasi

6.3.1 Komposisi bahan untuk amplifikasi

Komposisi bahan untuk amplifikasi (volume reaksi: 25 μ l) digambarkan pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1 - Komposisi bahan amplifikasi

Komposisi	Volume (μ l)
akuabides	18,375
10x PCR <i>buffer</i>	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTP <i>mix</i>	0,5
primer 1-F	0,5
primer 1-R	0,5
<i>taq</i> DNA polymerase	0,125
<i>template</i> DNA	1
Total volume	25

Jumlah komposisi yang diperlukan untuk amplifikasi terdiri dari 1 komposisi kontrol positif, 2 komposisi kontrol negatif (sampel negatif iridovirus dan akuabides) dan sejumlah contoh yang diuji.

6.3.2 Pengaturan suhu *thermocycler* untuk proses amplifikasi

Pengaturan suhu *thermocycler* untuk amplifikasi sesuai Tabel 2 berikut:

Tabel 2 Pengaturan suhu *thermocycler*

No.	Tahap	Suhu	Lama	Jumlah siklus
1	<i>Preheating</i>	94 °C	5 menit	1 siklus
2	Amplifikasi	94 °C 58 °C 72 °C	30 detik 60 detik 60 detik	30 siklus
3	<i>Extra-extension</i>	72 °C	5 menit	1 siklus
4	Penyimpanan	4 °C	~	

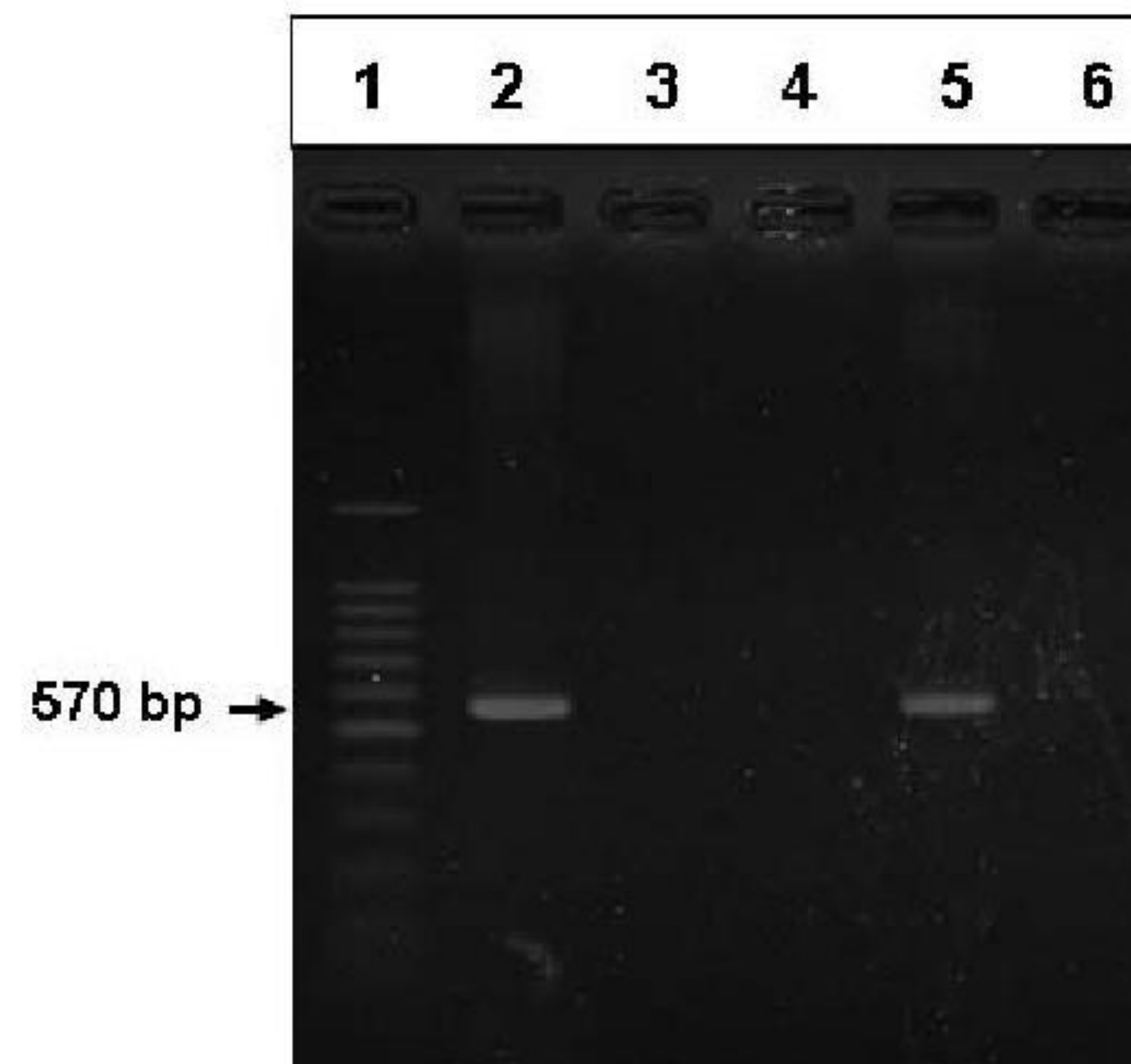
6.4 Elektroforesis

- Penyiapan larutan 0,5x *buffer* TBE
Tambahkan larutan 1 bagian larutan 5x *buffer* TBE ke dalam 9 bagian akuades.
- Pembuatan *agarose gel*
Buat gel *agarose* 2 % dengan melarutkan 2 gram *agarose* dalam 100 ml larutan 0,5 kali *buffer* TBE, kemudian dididihkan sehingga larutan menjadi bening. Setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C, tuang *agarose* pada cetakan yang telah dipasang dengan sisir dan biarkan sampai dingin.
- Perangkaian peralatan
Letakkan gel *agarose* dengan posisi sumuran pada kutub negatif, kemudian tambahkan larutan 0,5x *buffer* TBE sampai seluruh permukaan gel *agarose* terendam sempurna.
- Proses elektroforesis
Campurkan sebanyak 10 µl produk amplifikasi dengan 2 µl larutan 6x *loading dye* selanjutnya ambil 10 µl larutan tersebut kemudian masukkan ke dalam sumuran. Masukkan 10 µl *marker* DNA pada sumuran pertama atau terakhir. Lakukan elektroforesis pada tegangan 100 volt - 150 volt. Hentikan elektroforesis setelah pewarna *bromphenol blue* mencapai 2/3 bagian panjang *agarose*.
- Pewarnaan gel *agarose* dengan *ethidium bromide*
Rendam gel *agarose* dalam larutan *ethidium bromide* (0,5 µg/ml) selama 10 menit, kemudian rendam dalam akuades selama 10 menit. Amati hasil elektroforesis dengan UV *transilluminator* dan dokumentasikan.

7 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel *agarose* setelah proses elektroforesis terhadap produk amplifikasi yang diamati dengan UV *transilluminator*, maka:

- tidak terlihat adanya pita pada kontrol negatif (*blank*, akuabides);
- tidak terlihat adanya pita pada kontrol negatif (DNA negatif iridovirus);
- terlihat adanya pita berukuran 570 bp pada kontrol positif (DNA positif iridovirus);
- terlihat adanya pita berukuran 570 bp pada contoh yang terdeteksi adanya infeksi iridovirus;
- tidak terlihat adanya pita pada contoh yang tidak terdeteksi adanya infeksi iridovirus.



Keterangan gambar:

- 1 : *Marker* (100 bp DNA ladder)
- 2 : Kontrol positif (DNA positif iridovirus)
- 3 : Kontrol negatif (*blank*)
- 4 : Kontrol negatif (DNA negatif iridovirus)
- 5 : Contoh terdeteksi terinfeksi iridovirus
- 6 : Contoh tidak terdeteksi terinfeksi iridovirus

Gambar 1 - Hasil deteksi iridovirus pada ikan dengan metode PCR

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan larutan

1. Larutan 10 % Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

Cara membuat :

- a) Larutkan 100 g SDS *elektroforesis grade* ke dalam 900 ml akuades.
- b) Panaskan pada suhu 68 °C untuk melarutkan SDS.
- c) Atur pH 7,2 dengan menambahkan beberapa tetes HCl pekat.
- d) Tambahkan akuades hingga 1 l dan masukkan ke dalam botol reagen.
- e) Sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.
- f) Untuk membuat 1 % SDS, tambahkan 1 bagian 10 % larutan SDS dengan 9 bagian akuades.

2. Larutan Ethidium Bromide (0,5 µg/ml)

Cara membuat :

- a) Tambahkan 5 µl larutan *ethidium bromide* 10 mg/ml ke dalam 100 ml buffer TBE.
- b) Letakkan di tempat yang gelap agar larutan *ethidium bromide* lebih awet.

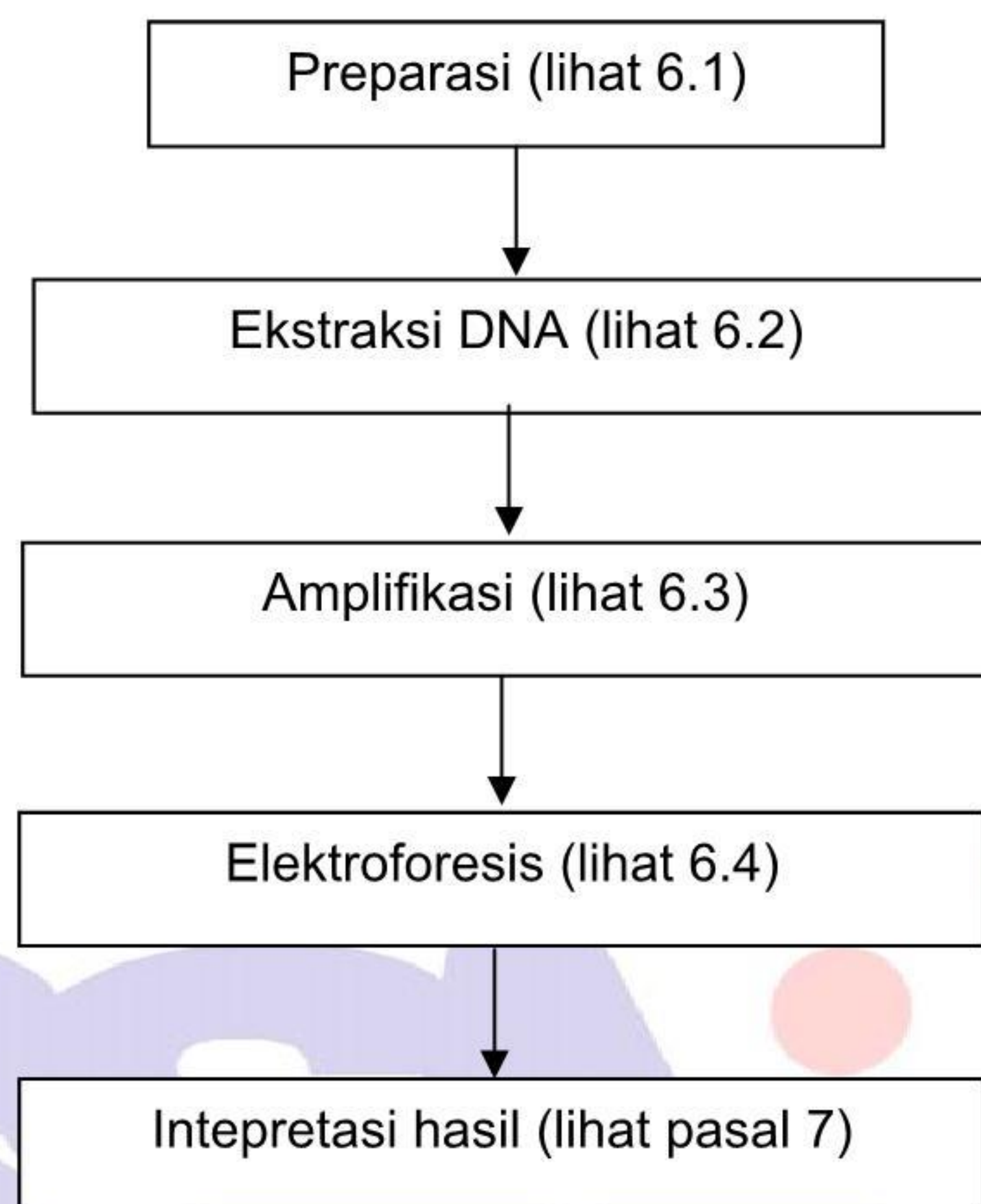
3. Larutan 3 M Sodium acetat pH 5,2

Cara membuat :

- a) Larutkan 408,1 g sodium acetat.3 H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) Atur pH menjadi 5,2 dengan menambahkan *asam acetat glacial*.
- c) Tambahkan akuades sampai 1 liter.
- d) Bagi dalam beberapa botol.
- e) Sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

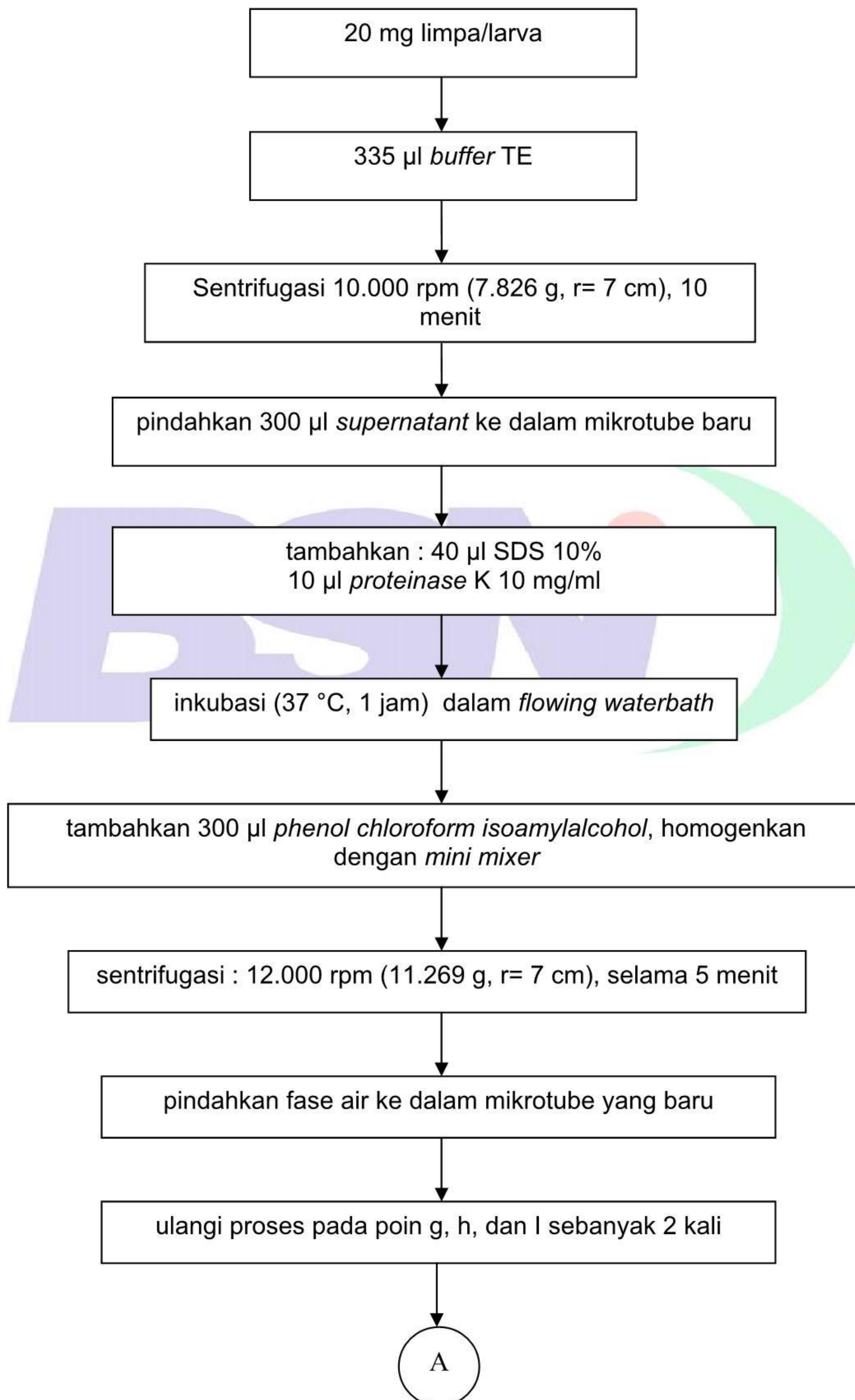
Lampiran B
(informatif)

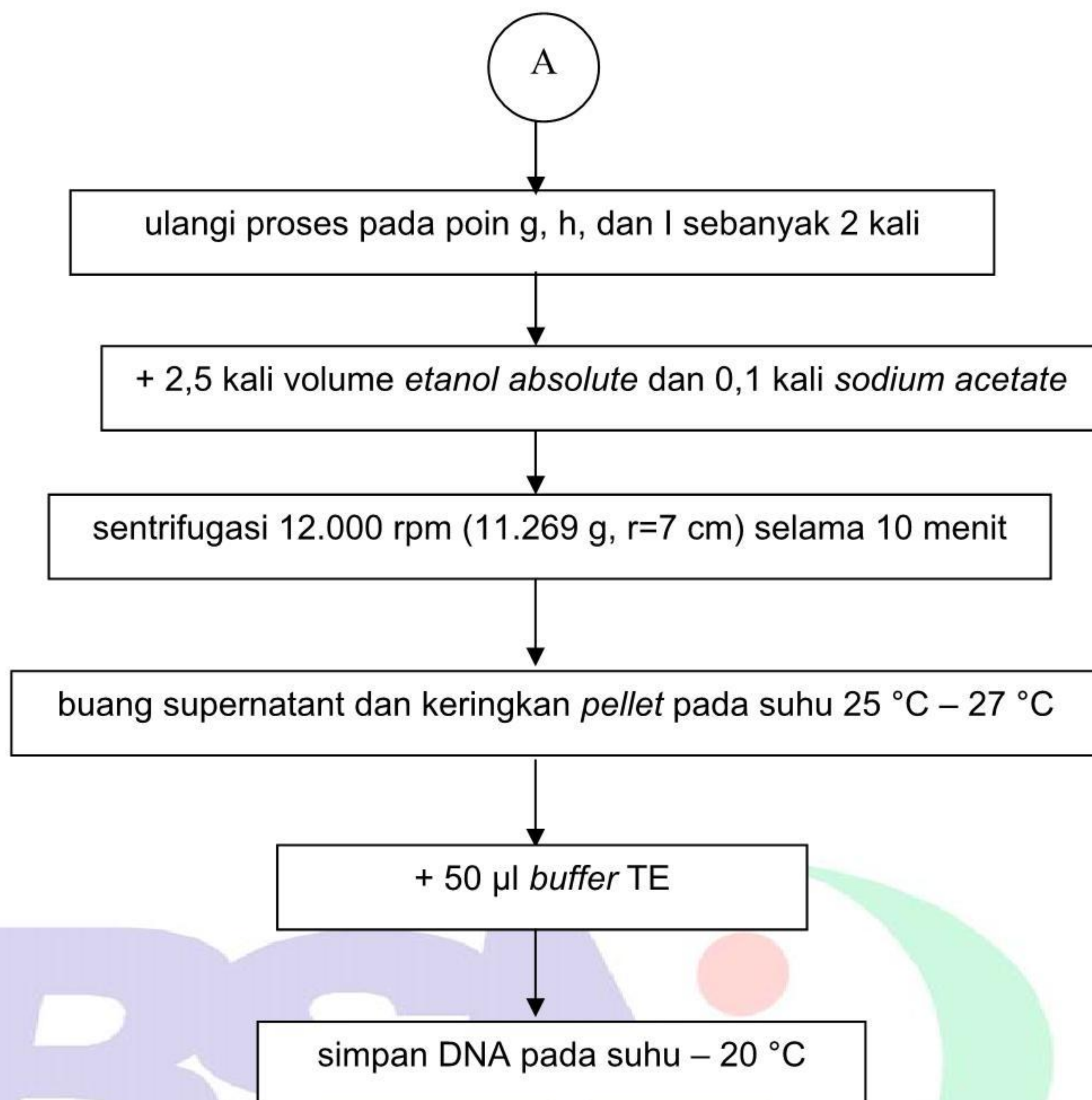
Diagram alur prosedur deteksi iridovirus pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)



Gambar B.1 - Diagram alur prosedur deteksi iridovirus pada ikan dengan metode PCR

Lampiran C
(normatif)
Diagram alur ekstraksi DNA





Gambar C.1 - Diagram alur ekstraksi DNA

Bibliografi

Anonimous. 2006. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Office des International des Epizooties (OIE) Perancis. Chapter 2.1.15

Wang, C.S., H.H. Shih, C.C.Ku & S.N. Chen. 2003. *Studies on Epizootic Iridovirus Infection among Red Sea Bream, Pagrus major (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan*. Journal of Fish Diseases 26 :127-133

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory. Manual*. CIHL Press, New York.







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id